

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η επίδραση της κακομεταχείρισης στη διαμόρφωση
των επιπέδων καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα
Sparus aurata»**

Αικατερίνη Χατζηπλή

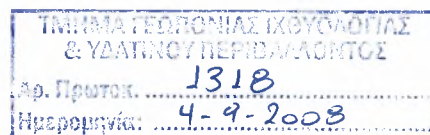
ΒΟΛΟΣ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 10517/1
Ημερ. Εισ.: 18-05-2012
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΙΥΠ
2008
ΧΑΤ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η επίδραση της κακομεταχείρισης στη διαμόρφωση των επιπέδων
καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα *Sparus aurata*»**

Αικατερίνη Χατζηπλή

ΒΟΛΟΣ 2008

“Η επίδραση της κακομεταχείρισης στη διαμόρφωση των επιπέδων καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα *Sparus aurata*.”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.
- Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- Γκολομάζου Ελένη Διδάσκουσα με το ΠΔ/407, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε από κοινού στα εργαστήρια Υδατοκαλλιεργειών και Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος κατά τη χρονική περίοδο 2007-2008.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την μονάδας πάχυνσης SEA FARM IONIAN A.E. του Διαύλου Ωρεών για τη διάθεση των ψαριών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Π. Παναγιωτάκη για τη βοήθειά της, το ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές, την ευελιξία και την καθοδήγηση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, για την αμέριστη βοήθεια, τη συμπαράσταση, την καθοδήγηση και τις ευκαιρίες που απλόχερα μου προσέφερε ως συνεπιβλέπων της διατριβής μου, αλλά και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ακόμη ευχαριστώ την κα Ε. Γκολομάζου διδάσκουσα με το ΠΔ/407 στην Ιχθυοπαθολογία, για τη βοήθειά της στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ Ι. Καραπαναγιωτίδη διδάσκων με το ΠΔ/407 στην Ιχθυολογία, για τη βοήθειά και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους φίλους, συμφοιτητές και συνεργάτες στα εργαστήρια των Υδατοκαλλιεργειών και Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Λ. Γιαννακοπούλου, Μ. Κάβουρα, Δ. Κασιμάτη, Ε. Μαλανδράκη και Ο. Ντανταλή για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την πειραματική διαδικασία και την επεξεργασία των δεδομένων.

Ευχαριστώ ακόμη, τους αγαπημένους μου φίλους Ελευθερία, Γιώργο και Τριανταφυλλιά για την πνευματική τους καθοδήγηση και τη συμπαράσταση στις εύκολες και στις δύσκολες στιγμές.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην αγαπημένη μου οικογένεια, στους γονείς και στην αδελφή μου, Ελένη, για την κατανόηση, την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν με πολλή αγάπη και στοργή στα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| 1.9.3 Βιότοπος..... | 14 |
| 1.9.4 Διατροφή στο φυσικό περιβάλλον..... | 14 |
| 1.9.5 Αναπαραγωγή..... | 15 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταπόνηση (stress) και παράγοντες που την προκαλούν

Ως καταπόνηση (stress) μπορεί να χαρακτηριστεί η επίδραση ποικίλων εξωτερικών και εσωτερικών παραγόντων (καταπονητικών παραγόντων), που προκαλεί μία μεταβολή στην ομοιοστασία ή στην κατάσταση προσαρμογής του οργανισμού.

Οι παράγοντες καταπόνησης μπορούν να ταξινομηθούν σε χημικούς, φυσικούς, βιολογικούς, ανθρωπογενείς, φυσιολογικούς ή φυσιοπαθολογικούς και ψυχολογικούς ή ηθολογικούς.

Στους εκτρεφόμενους ιχθείς, η επίδραση της καταπόνησης στην αύξηση/ανάπτυξη του σώματος, στην αναπαραγωγή, στην παραγωγικότητα και στην αντίσταση σε διάφορους νοσογόνους παράγοντες είναι ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας. Ειδικότερα, σε εκτρεφόμενους ιχθείς που υπόκεινται σε καταπόνηση παρατηρούνται: επιβράδυνση της αύξησης/ανάπτυξης του σώματος, μείωση της παραγωγικότητας (κρέας), διαταραχές της αναπαραγωγής, αυξημένη ευαισθησία σε νοσογόνους παράγοντες, χαμηλή ποιότητα κρέατος κ.λπ. (Iwama, 1974).

Κατά τη μαζική παραγωγή των ιχθύων, οι πιο σημαντικές αιτίες προκλήσεως καταπόνησης είναι οι διάφοροι χειρισμοί (μεταφορά, διαλογές, ζύγισμα κλπ.), η αυξημένη πυκνότητα εκτροφής, η ύπαρξη ακατάλληλου περιβάλλοντος διαβίωσης (υποβαθμισμένη ποιότητα νερού), καθώς και οι λανθασμένοι χειρισμοί των εκτρεφόμενων πληθυσμών από την πλευρά του εκτροφέα (ακανόνιστη παροχή τροφής, άσκοπες επισκέψεις στους χώρους εκτροφής κλπ.). Σε αυτά τα σημεία

εστιάζει η παρούσα μελέτη με σκοπό να εκτιμήσει το κατά πόσον οι ιχθείς καταπονούνται από τέτοιους χειρισμούς και πως αυτή η καταπόνηση αποτυπώνεται στο DNA τους (DNA damage).

1.2 Φυσιολογική ανταπόκριση του οργανισμού στην καταπόνηση

Η φυσιολογική ανταπόκριση και προσαρμογή των ιχθύων στην καταπόνηση είναι ανάλογη με αυτή των ανώτερων σπονδυλωτών. Χαρακτηρίζεται από μεταβολές στο αίμα και στους ιστούς ανεξάρτητα από το αν η καταπόνηση προέρχεται από ανθρώπινους χειρισμούς (τεχνικές εκτροφής, μεταφορά, θεραπεία ασθενειών), αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος (θολερότητα, μόλυνση, θερμοκρασιακές αλλαγές νερού) ή ηθολογικούς παράγοντες (φόβος, ιεραρχία, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών). Οι διάφορες φυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν, καθώς το ψάρι προσπαθεί να αντεπεξέλθει στην καταπόνηση, είναι αντισταθμιστικές (π.χ. προσαρμοστικές) και απαραίτητες για να επιτευχθεί εγκλιματισμός στις νέες συνθήκες. Όλες αυτές οι φυσιολογικές αλλαγές συνολικά, έχουν ονομαστεί ως Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (General Adaptation Syndrome-GAS).

Ο ιχθύς προσπαθεί να αντιδράσει απέναντι στον παράγοντα καταπόνησης, χρησιμοποιώντας τα ενεργειακά του αποθέματα. Οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της ομοιοστασίας προσπαθούν να πετύχουν τον εγκλιματισμό του ιχθύος στις νέες συνθήκες. Ένας ζωικός οργανισμός μπορεί να αντέξει την καταπόνηση για κάποιο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια του χρονικού αυτού διαστήματος μπορεί να φαίνεται ότι όλα είναι φυσιολογικά, στην πραγματικότητα όμως τα ενεργειακά του αποθέματα εξαντλούνται εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεων λόγω της ύπαρξης του παράγοντα καταπόνησης (Lines & Frost, 1999).

Στο στάδιο της προσαρμογής ή της εξάντλησης οι αντιδράσεις του οργανισμού έχουν σταθεροποιηθεί. Αν ο παράγοντας καταπόνησης δεν απομακρυνθεί, τα ενεργειακά αποθέματα του ιχθύος τελειώνουν και αυτός οδηγείται στην εξάντληση. Στη φάση αυτή, η ικανότητά του να αντιστέκεται σε νοσογόνους παράγοντες με τους οποίους βρίσκεται σε συνεχή επαφή μειώνεται δραματικά και μπορεί να αρρωστήσει ή ακόμη και να πεθάνει. Αν ο οργανισμός του ιχθύος δεν καταφέρει να προσαρμοσθεί, οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν οδηγούν με μαθηματική ακρίβεια

στο θάνατο. Το στάδιο της προσαρμογής ποικίλει ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια δράσης του παράγοντα καταπόνησης, το είδος του ιχθύος και την ατομική γενοτυπική αντοχή σε παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση (Rice, 1996).

Η αντίδραση του οργανισμού στην καταπόνηση μπορεί να περιλαμβάνει μεταβολές στη συμπεριφορά (επιθετικότητα, μεταβολές στην πρόσληψη τροφής, κ.λπ.), δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, ανοσοκαταστολή, καθώς και ανεπαρκή πέψη και απορρόφηση των συστατικών της τροφής. Ακόμη, είναι δυνατό να προκαλέσει ή να επιδεινώσει διάφορες διατροφικές ανεπάρκειες (Lines & Frost, 1999).

1.3 Συνέπειες της καταπόνησης

Πρόκειται για μία κατάσταση κατά την οποία ο οργανισμός αδυνατεί να προσαρμοστεί σε μεταβολές του περιβάλλοντος ή και σε εσωτερικές μεταβολές. Αν, βέβαια, οι μεταβολές αυτές είναι βραχείας διάρκειας, οι αντιδράσεις του οργανισμού, που αποσκοπούν στην προσπάθεια προσαρμογής του σ' αυτές τις μεταβολές, συνήθως δεν έχουν (αλλά μπορεί και να έχουν) μακροπρόθεσμα δυσμενείς συνέπειες. Υπερβολική όμως, σε ένταση ή διάρκεια καταπόνηση μπορεί να έχει σοβαρές δυσμενείς συνέπειες, όπως μη φυσιολογική συμπεριφορά, διαταραχές στην αναπαραγωγή, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, έλκη στο γαστρεντερικό σωλήνα, κλπ. (Power, 1996).

1.4 Επίδραση της καταπόνησης στην ανάπτυξη

Κατά τη χρόνια μορφή καταπόνησης παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ιχθύων, που οφείλεται κατά ένα μέρος στα παρατηρούμενα, στο αίμα τους, υψηλά επίπεδα κορτιζόλης. Έτσι, εναλλακτικά χρησιμοποιείται η μέτρηση της κορτιζόλης για την εκτίμηση της καταπόνησης. Η έννοια του μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης, στην περίπτωση αυτή, συνίσταται στην παρατηρούμενη ανεπιθύμητη σχέση μεταξύ της ποσότητας της χορηγηθείσης τροφής και της επιτευχθείσης ανάπτυξης των ιχθύων (αυξημένος συντελεστής εκμεταλλεύσεως της τροφής). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις καταβολικές ιδιότητες της κορτιζόλης από τις οποίες επιδιώκεται η κάλυψη των αυξημένων από την καταπόνηση ενεργειακών αναγκών των ιχθύων. Επίσης, πειράματα έχουν δείξει ότι η έκκριση της αυξητικής ορμόνης μπορεί να μειώνεται σε ιχθείς που καταπονούνται και

που στο αίμα τους υπάρχουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης. Έχει, ωστόσο, αποδειχθεί ότι η κορτιζόλη δεν αποκλείεται να διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, η οποία όμως με τη σειρά της είναι πιθανόν να προάγει τη δραστηριοποίηση των μηχανισμών εκκρίσεων της κορτιζόλης (Pankhurst *et al*, 1995).

1.5 Διάκριση σε οξεία και χρόνια μορφή καταπόνησης

Επίσης, η καταπόνηση μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια (οξύ και χρόνιο stress). Η οξεία μορφή καταπόνησης διαρκεί λεπτά ή ώρες και είναι ουσιαστικά μία φυσιολογική αντίδραση, που σταματά μόλις παύσει η επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα, αφήνοντας βέβαια τον οργανισμό με εξαντλημένες τις ενεργειακές του πηγές, αλλά κατά τα άλλα σε καλή φυσιολογική κατάσταση. Παρά το ενεργειακό κόστος, είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός προσαρμογής σε μεταβολές του περιβάλλοντος και ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί φυσικά συχνότατα. Αν η επίδραση του παράγοντα που προκαλεί την καταπόνηση συνεχίζεται, τότε αυτή είναι πλέον χρόνια (διαρκεί ημέρες, μήνες ή και περισσότερο). Παρόλο που και σ' αυτή την περίπτωση οι αντιδράσεις του οργανισμού αποσκοπούν στην προσαρμογή, μπορεί μακροπρόθεσμα να έχουν δυσμενείς συνέπειες στο μεταβολισμό, στο κυκλοφορικό, στο πεπτικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Weerd & Komen, 1998).

Κατά τη διαδικασία της μαζικής ελεγχόμενης παραγωγής των ιχθύων, οι περιπτώσεις οξείας και χρόνιας καταπόνησης είναι γεγονός. Χρόνια καταπόνηση εισάγει στους ιχθυοπληθυσμούς κυρίως η αυξημένη ιχθυοφόρτιση μέσα στους κλωβούς η οποία είναι αναγκαία συνθήκη για την επιτυχή εκτροφή και σχετίζεται άμεσα με τους οικονομικούς δείκτες της παραγωγής.

Επίσης, είναι απαραίτητοι ορισμένοι χειρισμοί οι οποίοι γίνονται προγραμματισμένα και αφορούν τον τρόπο διαχείρισης των ιχθυοπληθυσμών όπως π.χ. εμβολιασμοί, διαλογές κ.λπ.. Οι χειρισμοί αυτοί προκαλούν οξεία καταπόνηση η οποία οφείλεται σε έκθεση του ψαριού σε συνθήκες ατμόσφαιρας για ορισμένο χρονικό διάστημα. Στη βιβλιογραφία αυτό αναφέρεται σαν καταπόνηση που προκαλείται από αερισμό (handling stress).

Ο εξαναγκασμός των ιχθύων να αντιμετωπίσουν τις συνέπειες της καταπόνησης, συνεπάγεται συνεχή ενεργοποίηση ενεργειοβόρων βιοχημικών μηχανισμών, το κόστος των οποίων ζημιώνει τελικά τον ίδιο τον παραγωγό.

1.6 Η μέθοδος SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis) ή Comet assay

Πρόκειται για μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, με ηλεκτροφόρηση. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κατακερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετανάστευσή του προς την άνοδο (Ostling *et al.*, 1984; Tice, 1985).

Όσον αφορά στις λεπτομέρειες, η τεχνική μπορεί να παρουσιάζει διαφορές από το ένα εργαστήριο στο άλλο, αλλά στην ουσία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: προετοιμασία εναιωρήματος κυττάρων, προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης, κυτταρόλυση, ξετύλιγμα του DNA, ηλεκτροφόρηση, χρώση του DNA και μικροσκοπική ανάλυση της εικόνας. Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά (Εικ. 1). Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δεν μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται τα θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Σε μια δεδομένη θέση, το ποσό του DNA είναι ανάλογο της έντασης φθορισμού. Οι συνηθέστερες παράμετροι είναι η ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων με ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, το μήκος της ουράς και η τάση για κίνηση της ουράς (Klaude *et al.*, 1996; Nelms, 1997; Collins, 1997). Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά στο μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Σε αλκαλικό pH γίνεται το ξετύλιγμα και η μετουσίωση του DNA και ανιχνεύεται η βλάβη στο μονόκλωνο, ενώ σε ουδέτερο pH δεν γίνεται μετουσίωση και επομένως, ανιχνεύονται οι βλάβες της διπλής αλυσίδας. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και οι συνδεόμενες στο DNA πρωτεΐνες απομακρύνονται, ώστε να μην παρεμβάλλονται κατά τη μετανάστευση στο ηλεκτρικό πεδίο. Η προσεκτική έκπλυση του πηκτώματος σε διαλύματα κατάλληλου pH συντελεί στην απομάκρυνση και άλλων ιόντων που πιθανώς θα μετέβαλλαν τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

Οι Ostling και Johanson (1984) ήταν οι πρώτοι που μέτρησαν την καταστροφή του DNA σε κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης γνωστής ως μονοκυτταρική ηλεκτροφόρηση ή “Comet assay assay assay”. Όμως οι ουδέτερες συνθήκες που χρησιμοποιούνται σε αυτήν, επιτρέπουν την ανίχνευση ενός μόνο θραύσματος δίκλωνου DNA. Αργότερα, η εν λόγω τεχνική προσαρμόστηκε σε

αλκαλικές συνθήκες (Singh *et al.*, 1988), η οποία ηγήθηκε μιας ευαίσθητης έκδοσης η οποία μπορούσε να υπολογίσει μαζί και τα μονά και τα διπλά θραύσματα DNA, όπως επίσης και τα αλκαλικά ασταθή μέρη που εκφράζονταν ως θραύσματα στο DNA. Από την έναρξή της, η Comet assay έχει τροποποιηθεί σε διάφορα σημεία (βήματα) (lysis, electrophoresis) ώστε να γίνει κατάλληλη για τον υπολογισμό διαφόρων ειδών καταστροφής σε διαφορετικά κύτταρα (Collins, 2004: Speit & Hartmann, 2005). Η Comet assay είναι τώρα καλά καθιερωμένη, απλή, γρήγορη, ευμετάβλητη και ένα ευαίσθητο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο που μετρά την καταστροφή και την επισκευή του DNA ποσοτικοποιημένα σε ατομικά κύτταρα πληθυσμών (Olive & Banath, 2006). Κάποιες άλλες αλλοιώσεις του γενετικού υλικού, όπως οι διασταυρώσεις πολυμερούς (π.χ. μπάντες θυμιδίνης) και η οξειδωμένη (oxidative) καταστροφή του DNA μπορούν επίσης να μετρηθούν με την αλλοίωση συγκεκριμένων αντισωμάτων ή συγκεκριμένων επανορθωτικών ενζύμων στην Comet assay. Έχει κερδίσει ευρεία αποδοχή ως ένα εξαιρετικό εργαλείο στη θεμελιώδη μελέτη και καταστροφή του DNA (Speit & Hartmann 2005), ερευνώντας την τοξικότητα (Moller, 2005) και την ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση (Kassie *et al.*, Moller, 2006a).

1.7 Εφαρμογές – Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Μεταξύ άλλων, η μέθοδος εφαρμόζεται για α) τη μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, β) την καταγραφή των μεταλλαξιογόνων και των καρκινογόνων ουσιών *in vivo* και *in vitro* και γ) τον έλεγχο της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών. Τροποποιήσεις και παραλλαγές της αρχικής μεθόδου με χρήση ενζύμων επιδιόρθωσης, εξωγενών και ενδογενών, πολλαπλασιάζουν τις δυνατότητες εφαρμογής της. Σε σύγκριση με τις άλλες δοκιμασίες ανίχνευσης της βλάβης στο DNA, η μέθοδος Comet assay υπερέχει, διότι εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, είναι σχετικά εύκολη και απαιτεί μικρό χρόνο προετοιμασίας. Δίνει πληροφορίες για την κατάσταση κάθε κυττάρου και συνεπώς, επιτρέπει λεπτομερή στατιστική ανάλυση. Μπορεί να εφαρμοστεί στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και σε δείγματα που περιέχουν μικρό αριθμό κυττάρων (<10.000).

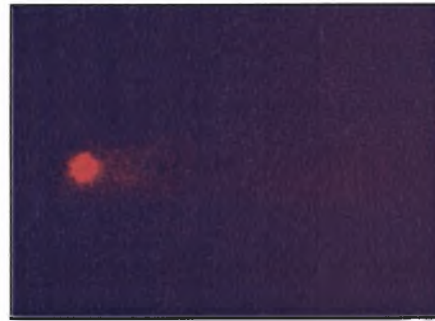
Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μετρά την απάντηση στη βλάβη του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα και συνεπώς, επιτρέπει τη μελέτη της ετερογένειας ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Για το λόγο αυτόν, η μέθοδος είναι σημαντική

στη διερεύνηση και μέτρηση της δράσης παραμέτρων όπως η υποξία ή η ακτινοβολία, που συντελούν στην επαγωγή της βλάβης του DNA (Nelms, 1997).

Λόγω του εκτεταμένου κατακερματισμού του DNA, που χαρακτηρίζει την αποπτωτική διεργασία και με τη βοήθεια της τεχνολογίας, που επιτρέπει τη χρήση ψηφιακής εικόνας για την παρατήρηση, η εφαρμογή της τεχνικής Comet assay διευκολύνει την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων, δεδομένου ότι το σύνολο του DNA μεταναστεύει έξω από την κεφαλή του κομήτη. Στην Εικόνα 1 φαίνονται δύο κύτταρα με ελάχιστο βαθμό κατακερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει μέσα στον πυρήνα. Αντίθετα, στην Εικόνα 2, όπου το αποπτωτικό κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πήκτωμα της αгарόζης (ουρά του κομήτη).



Εικόνα 1



Εικόνα 2

1.8 Ιδιαιτερότητα, ευαισθησία, και περιορισμοί της Comet assay

Η Comet assay τυγχάνει ευρείας αποδοχής στην ανίχνευση της καταστροφής και επιδιόρθωσης του DNA σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Όμως, υπάρχουν θέματα που σχετίζονται με την ιδιαιτερότητα, την ευαισθησία και τους περιορισμούς της μεθόδου που χρήζουν διευθέτησης από τοξικολόγους πριν γίνουν αποδεκτά από το ρυθμιστικό πλαίσιο εργασίας περιλαμβάνοντας δια-εργαστηριακή επικύρωση της *in vitro* και *in vivo* Comet assay.

Η διακύμανση στα αποτελέσματα της Comet assay είναι μεγάλη λόγω της ευαισθησίας και των ελαχίστων διαφορών στις συνθήκες διαφορετικών εργαστηρίων, καθώς και η επίδραση συγγεόμενων παραγόντων στις ανθρώπινες μελέτες (τρόπος ζωής, ηλικία, διατροφή, μεταξύ των οργανισμών και εποχική διακύμανση). Πιθανές μελέτες που υποστηρίζουν αυτό δεν έχουν διεξαχθεί ώστε να βρουν την προβλεπόμενη τιμή της Comet assay στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση, προάγοντας περιορισμούς

της εφαρμογής (Moller, 2006a). Από κύτταρο σε κύτταρο, από πηκτή σε πηκτή, από καλλιέργεια σε καλλιέργεια, από οργανισμό σε οργανισμό, καθώς και από ποικίλα συστήματα εικόνας ανάλυσης ή οπτικό σκοράρισμα και τη χρήση διαφορετικών παραμέτρων της Comet assay, συνεισφέρουν στις δια-εργαστηριακές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων.

Ο περιορισμός της Comet assay είναι ότι ανιχνεύει την καταστροφή του DNA στη μορφή θραυσμένων κλώνων. Η αλκαλική έκδοση ($\text{pH} > 13$) της assay εκτιμά απ' ευθείας τη ζημιά που έχει υποστεί το DNA ή αλκαλικές ασταθείς θέσεις, ενώ συγκεκριμένες κλάσεις της καταστροφής του DNA περιλαμβάνουν οξείδωση των βάσεων δεν είναι δυνατό να μετρηθούν. Η συγκεκριμένη και ευαίσθητη ανίχνευση αυτών των βλαβών απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων ενζύμων (Collins, 2004). Αυτά τα ένζυμα είναι βακτηριακά ένζυμα γλυκοσιλάσης/ενδονουκλεάσης, τα οποία αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη βλάβη και το μετατρέπουν σε ένα θραύσμα που μπορεί εύκολα να μετρηθεί από την Comet assay. Γι' αυτό το λόγο ευρείες κλάσεις οξειδωτικής καταστροφής του DNA και επηρεασμός του από υπερϊώδη φωτοπροϊόντα μπορούν να ανιχνευθούν ως αυξημένη ποσότητα του DNA στην ουρά (Moller 2006a). Οι οξειδωμένες πυριμιδίνες ανιχνεύονται με τη χρήση ενδονουκλεασών, ενώ οι οξειδωμένες πουρίνες με φορμαμιδοπυριμιδίνη DNA γλυκολάση (FPG). Τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο έχουν γίνει, ώστε να καθορίσουν την ανίχνευση θραυσμάτων δύο κλώνων (neutral Comet assay: Singh, 2000), μονόκλωνα θραύσματα ($\text{pH} 12.1$: Miyamae *et al.*, 1997), και απόπτωση (Singh, 2000). Η ουδέτερη Comet assay βοηθά επίσης στη διάκριση της απόπτωσης από τη νέκρωση κι αυτό αποδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές της Comet assay στα αποπτωτικά κύτταρα και σχεδόν μηδενικές για τα νεκρωτικά (Yasuhara *et al.*, 2003). Μια προσαρμογή της Comet assay αναπτύχθηκε, επίσης, η οποία καθιστά ικανή τη διάκριση των βιώσιμων, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (Morley *et al.*, 2006).

Η ουρά (%) του DNA (TM) και το Olive tail moment (OTM) δίνει μια καλή ένδειξη για τις μελέτες γενοτοξικότητας (Kumaravel & Jha, 2006) και όπως οι περισσότερες μελέτες, έχουν αναφέρει αυτές τις παραμέτρους κι έχουν προτείνει και τις δύο παραμέτρους για χρήσεις ρουτίνας. Από τότε που το OTM αναφέρεται ως αυθαίρετη μονάδα και τα διαφορετικά προγράμματα επεξεργασίας των δεδομένων

δίνουν ξεχωριστά αποτελέσματα, το TM θεωρείται καλύτερη και περισσότερο αξιόπιστη παράμετρος (Kumaravel & Jha, 2006).

1.9 Η τσιπούρα - *Sparus aurata*

1.9.1 Συστηματική ταξινόμηση της τσιπούρας *Sparus aurata*

Η τσιπούρα ή *Sparus aurata* (L.), ανήκει στην οικογένεια των Σπαρίδων (*Sparidae*), στην κλάση των οστεϊχθών (*Teleostei*). Η συστηματική του ταξινόμηση κατά τον Linnaeus (1758) είναι η εξής:

Βασίλειο: *Animalia*

Υποβασίλειο: *Metazoa*

Φύλο: *Chordata*

Υποφύλο: *Vertabrata*

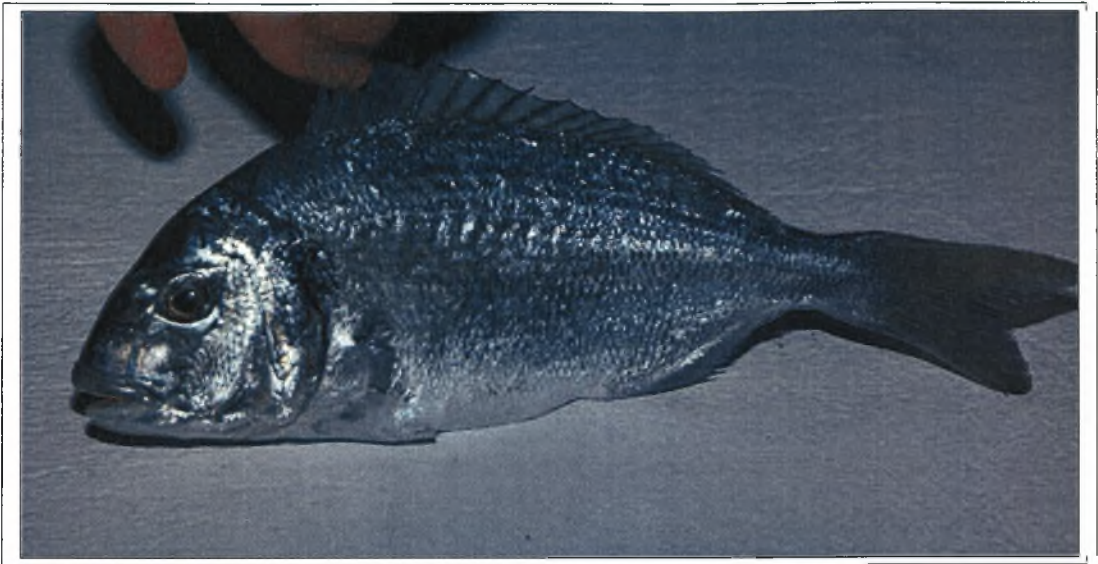
Κλάση: *Teleostei*

Υποκλάση: *Euteleostei*

Οικογένεια: *Sparidae*

1.9.2 Χαρακτηριστικά της τσιπούρας

Έχει σώμα ατρακτοειδές, πλευρικά πεπιεσμένο, κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος (Εικ. 3). Έχει κεφαλή ισχυρή, χείλη χονδρά και μεγάλους οφθαλμούς. Το μπροστινό τμήμα των σιαγόνων χαρακτηρίζεται από την παρουσία έξι κωνοειδών δοντιών, ενώ πλευρικά στην πάνω σιαγόνα έχει τέσσερις σειρές μυλοειδών δοντιών και 3 – 4 σειρές στην κάτω σιαγόνα. Τα μπροστινά δόντια είναι δυνατά, κυρτά και μυτερά. Στο μέτωπο ανάμεσα στα μάτια έχει μια λωρίδα σε σχήμα V και στην άκρη του βραγχιοκαλύμματος μια μαύρη κηλίδα. Γενικά έχει χρώμα ασημένιο – γκρι με πιο σκούρη πλάτη και περισσότερο ανοιχτό χρώμα στις πλευρές και την κοιλιά. Οι παρυφές του ουραίου πτερυγίου είναι μαύρες. Έχει μεγάλου μεγέθους κτενοειδή λέπια και θωρακικά πτερύγια. Το μήκος φτάνει μέχρι τα 50 - 80 cm και βάρος πάνω από 5 Kg. Ο αριθμός των ακτινών των πτερυγίων της είναι: D XI / 13 – 14 και A III / 11 – 12 (Νεοφύτου, 2001).



Εικόνα 3: Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

1.9.3 Βιότοπος

Ζει μοναχικό ή σε μικρά κοπάδια στις παράκτιες περιοχές και προτιμά τα υφάλμυρα νερά. Η γεωγραφική της εξάπλωση εκτείνεται από τον Ατλαντικό μέχρι τη Μεγάλη Βρετανία, τη Σενεγάλη και τη Μεσόγειο θάλασσα (Νεοφύτου, 2001).

Ανήκει στα ευρύθερμα είδη και γι' αυτό συναντάται σε νερά με θερμοκρασίες από 5° - 27° C. Είναι το πρώτο είδος ψαριού που κατά το φθινόπωρο εγκαταλείπει τις λιμνοθάλασσες για να επιστρέψει στην ανοιχτή θάλασσα. Οι τσιπούρες, που παραμένουν στις λιμνοθάλασσες μετά το κλείσιμο των εσοδευτικών στομιών των διβαριών, υποφέρουν από το κρύο του χειμώνα όταν η θερμοκρασία πολλές φορές στις αβαθείς αυτές υδάτινες εκτάσεις πλησιάζει τους 0° C.

Είναι ευρύαλο ψάρι με δυνατότητα επιβίωσης σε μεγάλο εύρος αλατότητας, ενώ το άριστο εύρος ανάπτυξης είναι από 25 - 40‰. Δεν είναι όμως το ίδιο ανεκτική στις τιμές του οξυγόνου. Φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλές τιμές οξυγόνου. Γενικά επιβιώνουν σε αβαθείς υδατοσυλλογές, αλλά προτιμούν νερά με βάθος μέχρι 50 -60 m.

1.9.4 Διατροφή στο φυσικό περιβάλλον

Η τσιπούρα ανήκει στην κατηγορία των σαρκοφάγων και αρπακτικών ψαριών. Ο τύπος πέψης, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται στον πεπτικό σωλήνα και οι σειρές των δοντιών τους, δικαιολογούν την κατάταξή τους αυτή. Έρευνες που έγιναν σε

φυσικούς πληθυσμούς σχετικά με τις τροφικές προτιμήσεις της τσιπούρας σε σχέση με το μέγεθος και την εποχή του έτους, έδειξαν ότι η βάση της διατροφής της συνίσταται από μαλάκια, τα οποία θρυμματίζει με τη βοήθεια των ισχυρών κυνοειδών δοντιών και τα οστρακόδερμα. Συμπληρωματικά καταναλώνονται πολύχαιτοι, δακτυλιοσκόληκες και φύκη, ενώ ευκαιριακά χρησιμοποιεί ψάρια και έντομα.

1.9.5 Αναπαραγωγή

Την άνοιξη εισέρχεται σε ημίκλειστες παράκτιες περιοχές υφάλμυρων νερών. Κατά τα μέσα του φθινοπώρου τις εγκαταλείπουν και επιστρέφουν στην ανοιχτή θάλασσα. Η έξοδος αυτή από τα ρηχά υφάλμυρα νερά συμπίπτει με την έναρξη της ωρίμανσης των γονάδων τους, η οποία ολοκληρώνεται με την έναρξη της φυσικής αναπαραγωγής που πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο.

Η τσιπούρα είναι ερμαφρόδιτο είδος και μάλιστα είναι πρώτανδρο. Έχει παρατηρηθεί ότι οι γονάδες αποτελούνται τόσο από ορχικό όσο και από ωοθηκικό ιστό από πολύ νεαρό στάδιο της ηλικίας της. Στα νεαρά άτομα η πλαγιοκοιλιακή χώρα, που περιέχει του όρχεις υπερσχύει κατά πολύ έναντι της ωοθηκικής ζώνης, ενώ στα ώριμα άτομα υφίσταται αντιστροφή της αναλογίας αυτής και πραγματοποιείται μετάβαση προς το θηλυκό. Αυτό συμβαίνει μετά το 2ο έτος της ηλικίας της (Νεοφύτου, 2001).

Εξαιτίας της μεγάλης αντοχής της σε αντίξοες συνθήκες, η τσιπούρα, απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις μεσογειακές υδατοκαλλιέργειες.

1.10 Σκοπός και στόχοι της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

α) η διερεύνηση των επιπέδων καταπόνησης στην τσιπούρα (*S. aurata*) που αντιπροσωπεύει ένα εκ των δύο πλέον εμπορικών ειδών που εκτρέφονται σε εντατικές συνθήκες στην Ελλάδα

β) η εκτίμηση της καταστροφής που προκαλεί η καταπόνηση στο DNA και πως αυτή καταγράφεται με την μέθοδο Comet assay assay.

Η κατάργηση προκλήθηκε σε αντιστοιχία με εκείνη που λαμβάνει χώρα στη ρουτίνα της παραγωγικής διαδικασίας σε συνθήκες εντατικής εκτροφής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του σταθμού του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κατά το χρονικό διάστημα από 02-2008 έως 06-2008 (Εικ.4). Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας, βάρους 60 g. και μήκους 14 cm κατά μέσο όρο, από τους ιχθυοκλωβούς της μονάδας πάχυνσης SEA FARM IONIAN A.E. του Διαύλου Ωρεών.

Τα ψάρια μεταφέρθηκαν με πλαστική τετράγωνη ισοθερμική δεξαμενή εξαλίευσης, όγκου 500 l., με συνεχή παροχή οξυγόνου, συγκέντρωσης 6 mg/l περίπου. Τα ψάρια είχαν παραμείνει σε ασιτία την προηγούμενη μέρα. Στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες του εργαστηρίου για περίπου μία εβδομάδα σε κυλινδροκωνικές δεξαμενές όγκου 500 l. Έπειτα, μοιράστηκαν σε οκτώ δεξαμενές, καθώς κατά το ίδιο διάστημα και στα πλαίσια του ίδιου πειράματος μελετήθηκαν άλλες δύο μεταχειρίσεις.

Έτσι, διεξήχθη παράλληλη μελέτη καταπόνησης των ιχθύων με δύο επιπλέον παράγοντες, την ασιτία και την επίδραση των βαρέων μετάλλων σε αυτά. Στον χώρο του σταθμού το πείραμα έλαβε χώρα σε δύο συστοιχίες δεξαμενών. Κάθε δεξαμενή περιείχε θαλασσινό νερό με σταθερή παροχή οξυγόνου. Το κλειστό κύκλωμα διαχείρισης του νερού περιελάμβανε μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο τύπου Tetra Pond PF 10.000 και UV (Εικ. 4 και 5).



Εικόνα. 4. Γενική εξωτερική άποψη του εργαστηρίου.



Εικόνα 5. Το μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο.

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ψάρια της παρούσας μελέτης χωρίστηκαν τυχαία σε δύο (2) μεταχειρίσεις και κάθε μεταχείριση κατέλαβε δύο δεξαμενές (2 δεξαμενές / μεταχείριση), ώστε το πείραμα να περιλαμβάνει και την επανάληψή του.

Οι μεταχειρίσεις που προέκυψαν ήταν:

i) των μαρτύρων M, η οποία ταΐζονταν δύο φορές σε καθημερινή βάση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

ii) η ομάδα της καταπόνησης/κακομεταχείρισης (handling stress - HS) που ταΐζονταν, επίσης, κανονικά, όπως ακριβώς και οι μάρτυρες.

Οι μετρήσεις της καταπόνησης (handling stress) πραγματοποιήθηκαν σταδιακά μέσα στο διάστημα των δύο μηνών για ένα (1), τρία (3) και πέντε (5) λεπτά. Η επιλογή των χρόνων έγινε βάσει των εφαρμογών που λαμβάνουν χώρα σε μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας, με σκοπό να διερευνηθεί η καταπόνηση που υφίσταται ο ιχθύς και πως αυτή καταγράφεται στο DNA του. Η καταπόνηση των ψαριών έγινε σε δίχτυ απόχης για τις χρονικές διάρκειες που αναφέρθηκαν. Όλοι οι χρόνοι πραγματοποιήθηκαν για τρία άτομα και άλλα τρία στην επανάληψή τους. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις μεταχειρίσεις εικοσιτέσσερα (24) ψάρια, δηλαδή έξι για την κάθε χρονική διάρκεια που μελετήθηκε. Μία ημέρα πριν από την κάθε

κακομεταχείριση τα ψάρια κρατούνταν σε νηστεία. Πριν από κάθε υποβολή των ψαριών σε συνθήκες καταπόνησης ζυγίζονταν και παίρνονταν μετρήσεις σταθερού μήκους.

Η διαδικασία της μέτρησης ήταν η ακόλουθη. Αρχικά τα ψάρια εξαλειούνταν από τις δεξαμενές με απόχη και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε κυκλικές περιστροφές μέσα σε αυτήν για τα χρονικά διαστήματα του ενός, των τριών και των πέντε λεπτών. Έπειτα, τοποθετούνταν σε πλαστική λεκάνη με αναισθητικό (φαινοξυαιθυλο-αλκοόλη), για τον καλύτερο χειρισμό κατά τη θανάτωση. Μετά το στάδιο της αναισθησίας, μετρούνταν το σταθερό μήκος (Εικ. 6). και το βάρος τους (ζυγαριά τύπου PRECISA 310M (Εικ. 7). Το ψάρι μετά την αναισθησία του, θυσιάζονταν και του αφαιρούνταν το συκώτι από το οποίο γινόταν άμεση απομόνωση των ηπατοκυττάρων και εφαρμογή της Comet assay τεχνικής.



Εικόνα 6. Μέτρηση μήκους

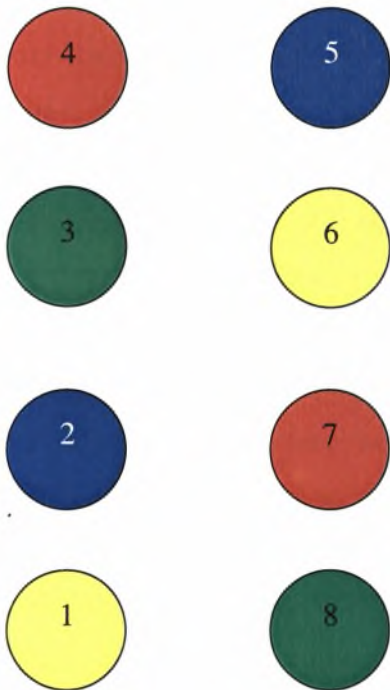


Εικόνα 7. Μέτρηση βάρους

Στις Εικόνες 8 και 9 δίνεται μια γενική άποψη του εσωτερικού του σταθμού.




Εικόνα 8. Γενική άποψη του εσωτερικού του σταθμού - συστοιχίες δεξαμενών των 500 lt.



Εικόνα 9: Σχηματική παράσταση της διάταξης των μεταχειρίσεων των ψαριών του πειράματος.

Μεταχειρίσεις

: Μάρτυρες

: Handling Stress (HS)

: Ασιτία (S)

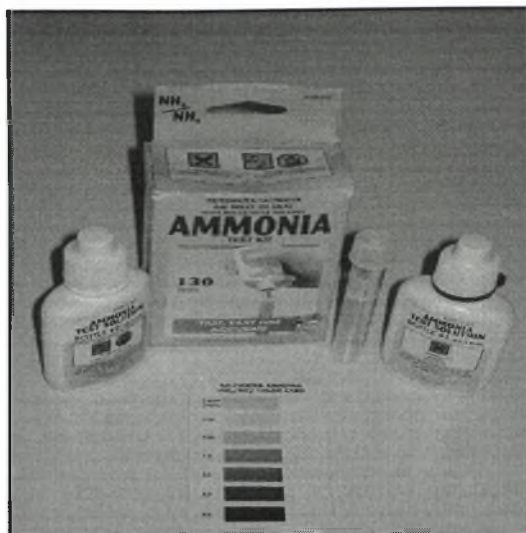
: Βαρέα Μέτταλα (HM)

Στα ψάρια προσφέρονταν τροφή 2 φορές την ημέρα (09.00 και 16.00). Οι ιχθυοτροφές ήταν σύμψηκτα (pellets) διαμέτρου 3,5 mm της εταιρίας Feedus, τύπου Blueline 45/20. Η σύσταση των ιχθυοτροφών ήταν η ακόλουθη: 45% πρωτεΐνη, 20% λίπη, 10% υγρασία, 1,5% ίνες, και 9% τέφρα. Η προσφερόμενη ποσότητα τροφής ήταν αυτή που πρότεινε μέσα από τους πίνακες εκτροφής της η εταιρία ιχθυοτροφών (συναρτήσει της θερμοκρασίας και του μεγέθους των ψαριών).

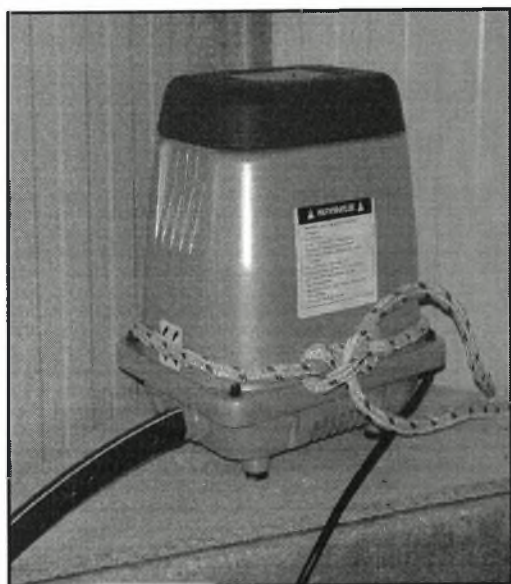
Το νερό των δεξαμενών ανακυκλώνονταν κατά τη διάρκεια της ημέρας ($6,5 \text{ m}^3/\text{h}$) περνώντας με τη βοήθεια αντλιών από μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο και στη συνέχεια από υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η ανανέωση νερού γίνονταν όταν αυτή κρινόταν σκόπιμη. Σε καθημερινή βάση τηρούνταν συγκεκριμένη υγιεινή των δεξαμενών. Η μέση θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 22°C . Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό, οι οποίες καταγράφονταν κάθε μέρα (οξυγονόμετρο Hanna hi 9143) (Εικ. 10) μετά το πρώτο τάισμα, ήταν πάντοτε πάνω από 5 p.p.m. Σε κάθε δεξαμενή υπήρχαν δύο πέτρες αέρα για το διασκορπισμό του παρεχόμενου αέρα από τους δύο αεροσυμπιεστές, έτσι ώστε να μην υπάρχει περίπτωση μη οξυγόνωσης του νερού λόγω βλάβης κάποιου από τους δύο. Επίσης, για την παροχή του αέρα είχαν τεθεί σε λειτουργία δύο αεροαντλίες (Εικ. 12 & 13). Οι δύο αεροαντλίες δούλευαν εναλλάξ ανά μία ώρα, με την βοήθεια χρονοδιακόπτη, με σκοπό την καλή και ασφαλή τους λειτουργία. Η αλατότητα καθώς και το pH του νερού μετριόταν εβδομαδιαίως (αλατόμετρο WTW LF 330 και pH-άμετρο Metrohm). Η αμμωνία κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές σύμφωνα με τις ενδείξεις του τεστ NH_3/NH_4 TETRATEST (Εικ. 11).



Εικόνα 10. Οξυγονόμετρο



Εικόνα 11. Test αμμωνίας.



Εικόνα 12. Εσωτερική αεραντλία.



Εικόνα 13. Εξωτερική αεραντλία.



Εικόνα 14. Εσωτερικό δεξαμενής.



Εικόνα 15. Άποψη δεξαμενών.

Μετά τη θανάτωση των ψαριών και τη λήψη των ζωτικών τους οργάνων (ήπατα), η διαδικασία συνεχιζόταν στο εργαστήριο Γενετικής Υδρόβιων Οργανισμών. Έγινε αρχικά απομόνωση των ηπατοκυττάρων και στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της βλάβης του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάλυσης Κομητών (Comet assay/Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis) υπό αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 12$) που αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Singh *et al.*, (1988). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μονόκλωνων κομματιών DNA (single strand breaks/SSBs) που εμφανίζονται μετά τη διάσπαση του γενετικού υλικού. Η εμφάνιση SSBs αντιπροσωπεύει διαταραχή της δομικής ακεραιότητας του γενετικού υλικού και χαρακτηρίζεται ως βλάβη του DNA (DNA damage)

Σύμφωνα με τη μέθοδο, αντικειμενοφόροι που είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί στην κατάψυξη, καλύφθηκαν με 200 μl 0,5% NMP (normal melting point agarose) αγαρόζης σε διάλυμα PBS (135 nmol/NaCl, 2.5 mmol/KCl, $\text{pH} = 7,4$). Έπειτα, αυτές καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και διατηρήθηκαν σε σκοτεινό μέρος, στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

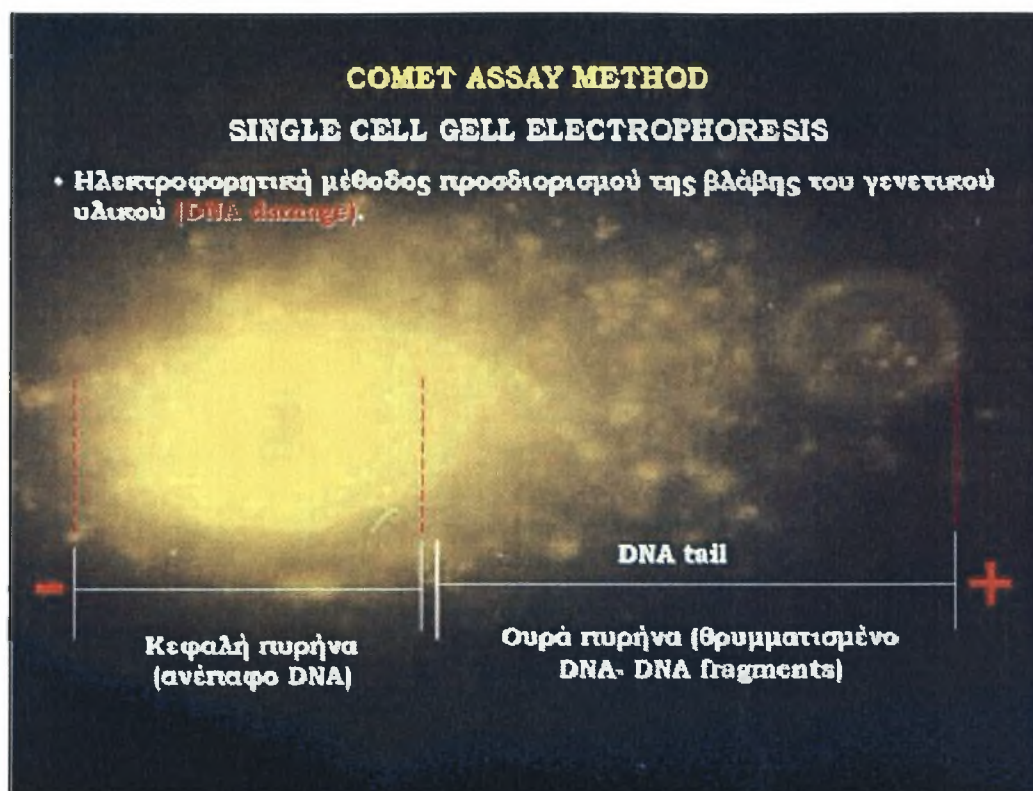
Από την απομόνωση των ηπατοκυττάρων προέκυπτε κυτταρικό αιώρημα από το οποίο 20 μl αναμιγνύονταν με 80 μl 0.5% LMP (low melting point agarose) αγαρόζης σε διάλυμα PS και στη συνέχεια μεταφέρονταν με πιπέττα σε αντικειμενοφόρο πλάκα που περιείχε NMP αγαρόζη. Μετά τοποθετούνταν οι

καλυπτρίδες και μεταφέρονταν οι αντικειμενοφόροι σε γυάλινη πλάκα πάνω σε πάγο, όπου και παρέμεναν για να στερεοποιηθεί η αγαρόζη για δέκα περίπου λεπτά. Αργότερα η καλυπτρίδα απομακρύνονταν και οι αντικειμενοφόροι εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 100 nmol/EDTA, 10 mmol/TRIS, 10% DMSO, 1% TRITON X100, 1% sodium sarcosinate, pH = 10), όπου και παρέμεναν για μία ώρα στους 4°C σε σκοτεινό μέρος, προκειμένου να απομακρυνθούν οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, οι πλάκες πλένονταν με απεσταγμένο νερό και τοποθετούνταν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ηλεκτροφορητικό διάλυμα (0.075 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>12) για 20 λεπτά, προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη του γενετικού υλικού. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε 25 V (1V/cm, 300 mA) για 20 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Τέλος, οι πλάκες απομακρύνονταν και πλένονταν για 5 λεπτά με διάλυμα εξουδετέρωσης (0,4 M TRIS, pH= 7.5). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης συνέβαινε η απομόνωση των πυρήνων πάνω στην αντικειμενοφόρο. Για την εκτίμηση της βλάβης του γενετικού υλικού, ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των πλακών, όπου διακρινόταν το γενετικό υλικό των πυρήνων, το οποίο βαφόταν με προσθήκη 50 μl βρωμιούχου αιθιδίου (20 μg/ml). Συγκεκριμένα, οι πυρήνες εξετάστηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού και σε μεγέθυνση 100X (ZEISS, HBO 50/AC). Οι πυρήνες εμφανίζονταν ως κομήτες, όπου την ουρά αποτελούν τα θραύσματα, ενώ την κεφαλή το άθικτο γενετικό υλικό σε ειδικό πρόγραμμα του μικροσκοπίου (ProgRes Capture Pro, rets. 2.1)(Εικ. 9).

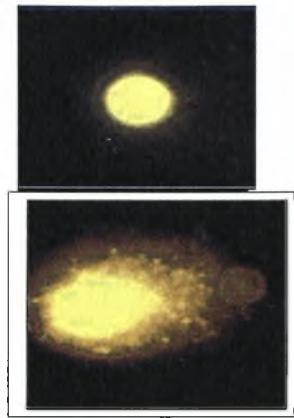
Επιπλέον, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του ειδικού προγράμματος casp, (Konca, 2006), το οποίο έχει τη δυνατότητα να δίνει τα στοιχεία του κάθε κομήτη, όπως το ποσοστό του γενετικού υλικού στην ουρά ή την κεφαλή και το μήκος της ουράς.

Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα έγινε ανάλυση 100 περίπου κομητών. Τα αποτελέσματα είναι δυνατό να ομαδοποιηθούν και να ταξινομηθούν σε 5 διαφορετικές κλάσεις (0-4), ανάλογα με το ποσοστό βλάβης του γενετικού υλικού, σύμφωνα με τα κριτήρια που θεσπίστηκαν από τους Andersen *et al.*, (1994). Συγκεκριμένα, η κλάση 0 αντιπροσωπεύει τους κομήτες στους οποίους το ποσοστό βλάβης του γενετικού υλικού, δηλαδή το ποσοστό του γενετικού υλικού, το οποίο μετά το θρυμματισμό του έχει μεταναστεύσει στην ουρά δεν ξεπερνά το 5% του

συνολικού ποσού του γενετικού υλικού. Με ανάλογο τρόπο, στην κλάση 1 ανήκουν οι κομήτες με ποσοστό βλάβης 5-20% , στην κλάση 2 οι κομήτες με ποσοστό βλάβης 20-40%, στην κλάση 3 οι κομήτες με ποσοστό βλάβης 40-75% και η κλάση 4 στην οποία οι κομήτες έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη βλάβη του γενετικού υλικού σε ποσοστό μεγαλύτερο από 75% του συνολικού ποσού (Εικ. 17).

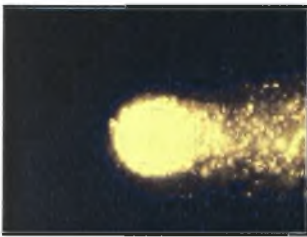


Εικόνα 17. Πυρήνας σε σχήμα κομήτη, όπως προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο Comet assay. Στην φωτογραφία διακρίνονται η κεφαλή του κομήτη, που αποτελείται από το άθικτο γενετικό υλικό, καθώς και η ουρά που αποτελείται από το θρυμματισμένο γενετικό υλικό (DNA fragment). Το χαρακτηριστικό σχήμα κομήτη προκύπτει καθώς τα κομμάτια του γενετικού υλικού που έχουν υποστεί θρυμματισμό μετακινούνται προς το θετικό πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, λόγω του αρνητικού τους φορτίου (Νταϊλιάνης, 2005).

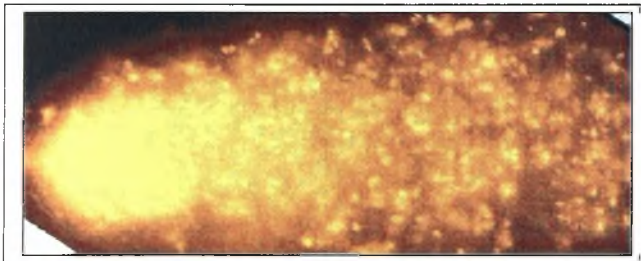


Κλάση 0

Κλάση 1



Κλάση 2



Κλάση 3



Κλάση 4

Εικόνα 18. Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, στις οποίες διακρίνονται οι 5 κλάσεις κομητών. Κάθε κλάση αντιπροσωπεύει διαφορετικό

ποσοστό βλάβης του DNA (Andersen *et al.*, 1994). Κλάση 0: ποσοστό βλάβης <5%. Κλάση 1: ποσοστό βλάβης 5-20%. Κλάση 2: ποσοστό βλάβης > 20%. Κλάση 3: ποσοστό βλάβης 40-75%. Κλάση 4: ποσοστό βλάβης >75%, (φωτ. Σ. Νταϊλιάνης). Η ανάλυση των εικόνων και το ποσοστό βλάβης του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα kinetic image analysis του εργαστηρίου Επιδιορθωτικών μηχανισμών DNA, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αθήνα.

Τα επίπεδα βλάβης του γενετικού υλικού εκφράζονται ως το % ποσοστό του γενετικού υλικού που αντιστοιχεί στην ουρά του κομήτη (% DNA in the tail).

2.2 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση όλα τα σύνολα των δεδομένων δοκιμάστηκαν ως προς την κανονικότητα των συχνοτήτων με το τεστ των Kolmogorov-Smirnov και την ισοδυναμία των διακυμάνσεων σύμφωνα με το τεστ του Levene. Οι μεταβλητές που μετρήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος casp για κάθε κομήτη είναι τα Head Length, Tail Length, Comet Length, Head DNA, Tail DNA, Tail Moment και Olive Tail Moment. Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας – ANOVA με έλεγχο το κριτήριο q Tukey και επίπεδο σημαντικότητας το $P < 0,001$. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τα στατιστικά πακέτα Excel και SPSS 14.0.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα (μέσος όρος, τυπική απόκλιση, τυπικό σφάλμα και αριθμός δείγματος N, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν φαίνονται στην πρώτη στήλη και στη δεύτερη φαίνονται τα κύτταρα).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης με το κριτήριο q Tukey και επίπεδο σημαντικότητας το $P < 0,001$.

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error |
|------------|---------|------|-----------|----------------|------------|
| TailMoment | control | 597 | .1726123 | .92751272 | .03796057 |
| | 1min | 608 | 11.84547 | 23.70464893 | .96135046 |
| | 3min | 863 | 4.5781091 | 16.23135526 | .55252176 |
| | 5min | 575 | 7.8827746 | 17.63382440 | .73538131 |
| | Total | 2643 | 5.9737412 | 17.31403829 | .33678271 |
| LHead | control | 597 | 135.817 | 17.3039 | .7082 |
| | 1min | 608 | 143.138 | 31.3005 | 1.2694 |
| | 3min | 863 | 144.330 | 28.1184 | .9572 |
| | 5min | 575 | 132.259 | 25.4827 | 1.0627 |
| | Total | 2643 | 139.507 | 26.7736 | .5208 |
| LTail | control | 597 | 9.0452 | 12.19114 | .49895 |
| | 1min | 608 | 96.2056 | 86.15328 | 3.49398 |
| | 3min | 863 | 71.9849 | 80.71988 | 2.74774 |
| | 5min | 575 | 89.4017 | 91.00418 | 3.79514 |
| | Total | 2643 | 67.1290 | 82.07650 | 1.59650 |
| LComet | control | 597 | 144.8626 | 19.79122 | .81000 |
| | 1min | 608 | 239.3438 | 90.31356 | 3.66270 |
| | 3min | 863 | 216.3152 | 80.12922 | 2.72763 |
| | 5min | 575 | 221.6609 | 91.78517 | 3.82771 |
| | Total | 2643 | 206.6360 | 84.11716 | 1.63620 |
| HeadDNA | control | 597 | 99.3896 | 1.26584 | .05181 |
| | 1min | 608 | 92.8431 | 8.76974 | .35566 |
| | 3min | 863 | 97.0124 | 4.09708 | .13947 |
| | 5min | 575 | 95.1707 | 7.23481 | .30171 |
| | Total | 2643 | 96.1896 | 6.34177 | .12336 |
| TailDNA | control | 597 | .6104 | 1.26584 | .05181 |
| | 1min | 608 | 7.1569 | 8.76974 | .35566 |
| | 3min | 863 | 2.9876 | 4.09708 | .13947 |
| | 5min | 575 | 4.8293 | 7.23481 | .30171 |
| | Total | 2643 | 3.8104 | 6.34177 | .12336 |
| OTM | control | 597 | .3917 | .87284 | .03572 |
| | 1min | 607 | 8.1031 | 13.98424 | .56760 |
| | 3min | 863 | 3.2959 | 9.32263 | .31735 |
| | 5min | 575 | 5.2707 | 9.55021 | .39827 |
| | Total | 2642 | 4.1739 | 10.02650 | .19507 |

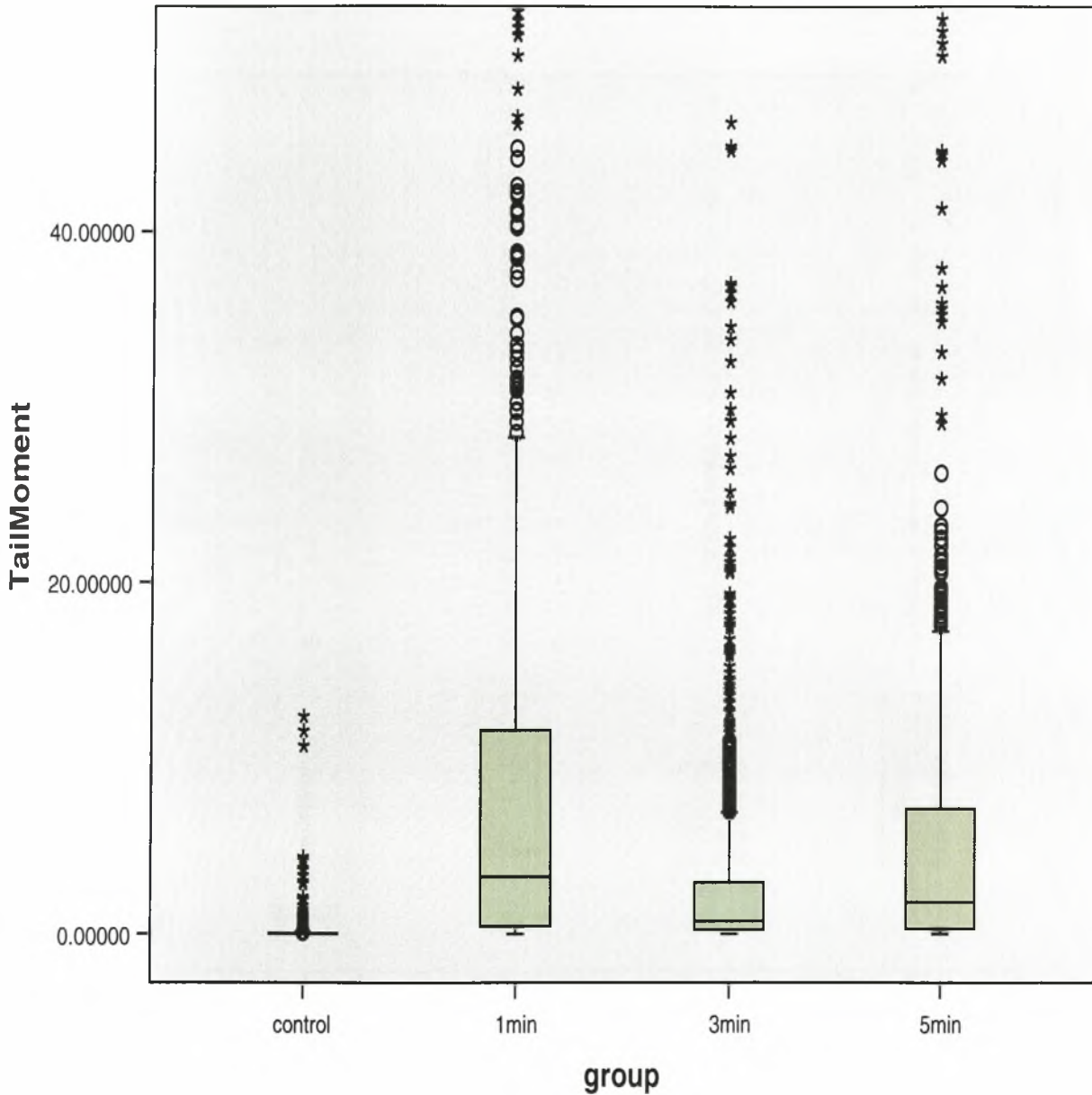
Πίνακας 2. Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ χρόνων και μεταχειρίσεων και απεικόνιση των διαφορών των μέσων τιμών και της σημαντικότητάς τους.

| Dependent Variable | (I) group | (J) group | Mean Difference (I-J) | Std. Error |
|--------------------|-----------|-----------|-----------------------|------------|
| TailMoment | control | 1min | -11.672856* | .96949830 |
| | | 3min | -4.4054968* | .89572841 |
| | | 5min | -7.7101623* | .98318490 |
| | 1min | control | 11.672856* | .96949830 |
| | | 3min | 7.26735963* | .89092600 |
| | | 5min | 3.96269414* | .97881168 |
| | 3min | control | 4.40549677* | .89572841 |
| | | 1min | -7.2673596* | .89092600 |
| | | 5min | -3.3046655* | .90580060 |
| | 5min | control | 7.71016226* | .98318490 |
| | | 1min | -3.9626941* | .97881168 |
| | | 3min | 3.30466549* | .90580060 |
| LHead | control | 1min | -7.3207* | 1.5162 |
| | | 3min | -8.5128* | 1.4008 |
| | | 5min | 3.5583 | 1.5376 |
| | 1min | control | 7.3207* | 1.5162 |
| | | 3min | -1.1921 | 1.3933 |
| | | 5min | 10.8790* | 1.5308 |
| | 3min | control | 8.5128* | 1.4008 |
| | | 1min | 1.1921 | 1.3933 |
| | | 5min | 12.0711* | 1.4166 |
| | 5min | control | -3.5583 | 1.5376 |
| | | 1min | -10.8790* | 1.5308 |
| | | 3min | -12.0711* | 1.4166 |
| LTail | control | 1min | -87.16037* | 4.33872 |
| | | 3min | -62.93971* | 4.00859 |
| | | 5min | -80.35651* | 4.39998 |
| | 1min | control | 87.16037* | 4.33872 |
| | | 3min | 24.22066* | 3.98710 |
| | | 5min | 6.80385 | 4.38040 |
| | 3min | control | 62.93971* | 4.00859 |
| | | 1min | -24.22066* | 3.98710 |
| | | 5min | -17.41680* | 4.05366 |
| | 5min | control | 80.35651* | 4.39998 |
| | | 1min | -6.80385 | 4.38040 |
| | | 3min | 17.41680* | 4.05366 |
| LComet | control | 1min | -94.48110* | 4.42351 |
| | | 3min | -71.45253* | 4.08692 |
| | | 5min | -76.79822* | 4.48596 |
| | 1min | control | 94.48110* | 4.42351 |
| | | 3min | 23.02857* | 4.06501 |
| | | 5min | 17.68288* | 4.46600 |
| | 3min | control | 71.45253* | 4.08692 |
| | | 1min | -23.02857* | 4.06501 |
| | | 5min | -5.34569 | 4.13288 |
| | 5min | control | 76.79822* | 4.48596 |
| | | 1min | -17.68288* | 4.46600 |
| | | 3min | 5.34569 | 4.13288 |

Πίνακας 2. Συνέχεια από παραπάνω

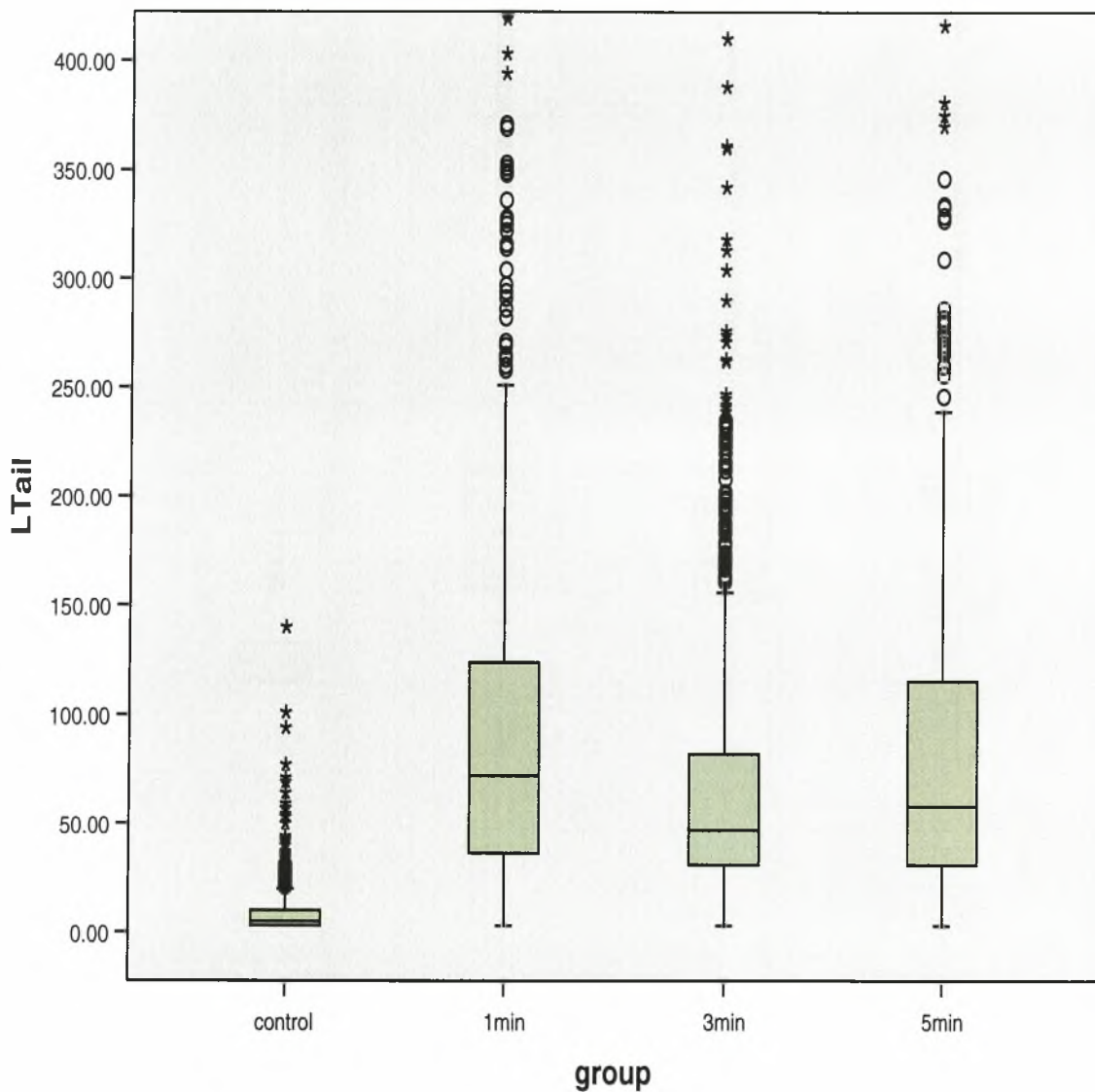
| | | | | |
|---------|---------|---------|-----------|--------|
| HeadDNA | control | 1min | 6.54651* | .34048 |
| | | 3min | 2.37720* | .31457 |
| | | 5min | 4.21894* | .34528 |
| | 1min | control | -6.54651* | .34048 |
| | | 3min | -4.16931* | .31288 |
| | | 5min | -2.32756* | .34375 |
| | 3min | control | -2.37720* | .31457 |
| | | 1min | 4.16931* | .31288 |
| | | 5min | 1.84175* | .31811 |
| | 5min | control | -4.21894* | .34528 |
| | | 1min | 2.32756* | .34375 |
| | | 3min | -1.84175* | .31811 |
| TailDNA | control | 1min | -6.54651* | .34048 |
| | | 3min | -2.37720* | .31457 |
| | | 5min | -4.21894* | .34528 |
| | 1min | control | 6.54651* | .34048 |
| | | 3min | 4.16931* | .31288 |
| | | 5min | 2.32756* | .34375 |
| | 3min | control | 2.37720* | .31457 |
| | | 1min | -4.16931* | .31288 |
| | | 5min | -1.84175* | .31811 |
| | 5min | control | 4.21894* | .34528 |
| | | 1min | -2.32756* | .34375 |
| | | 3min | 1.84175* | .31811 |
| OTM | control | 1min | -7.71146* | .55689 |
| | | 3min | -2.90420* | .51430 |
| | | 5min | -4.87902* | .56452 |
| | 1min | control | 7.71146* | .55689 |
| | | 3min | 4.80726* | .51179 |
| | | 5min | 2.83244* | .56223 |
| | 3min | control | 2.90420* | .51430 |
| | | 1min | -4.80726* | .51179 |
| | | 5min | -1.97482* | .52009 |
| | 5min | control | 4.87902* | .56452 |
| | | 1min | -2.83244* | .56223 |
| | | 3min | 1.97482* | .52009 |

Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι μέσοι όροι της μεταβλητής Tail Moment για κάθε χρονική διάρκεια καταπόνησης στις δύο μεταχειρίσεις (μάρτυρας και καταπόνηση).



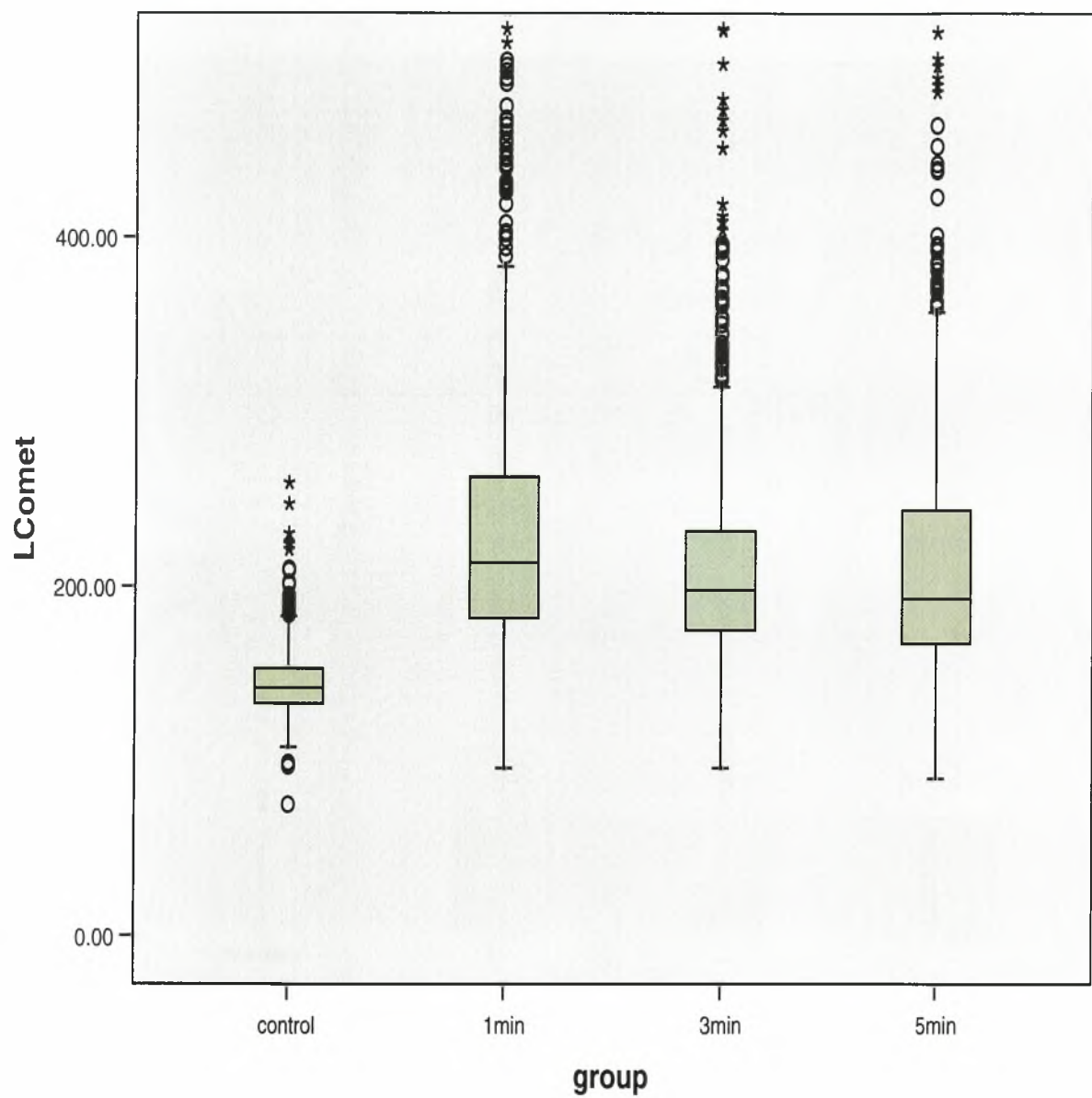
Σχήμα 1. Γραφική απεικόνιση της μεταβλητής Tail Moment με τις μεταχειρίσεις των ψαριών για διαφορετικούς χρόνους.

Στο Σχήμα 2 απεικονίζονται οι μέσοι όροι της μεταβλητής μήκος ουράς του κομήτη (Tail Length) για κάθε χρονική διάρκεια καταπόνησης στις δύο μεταχειρίσεις (μάρτυρας και καταπόνηση).



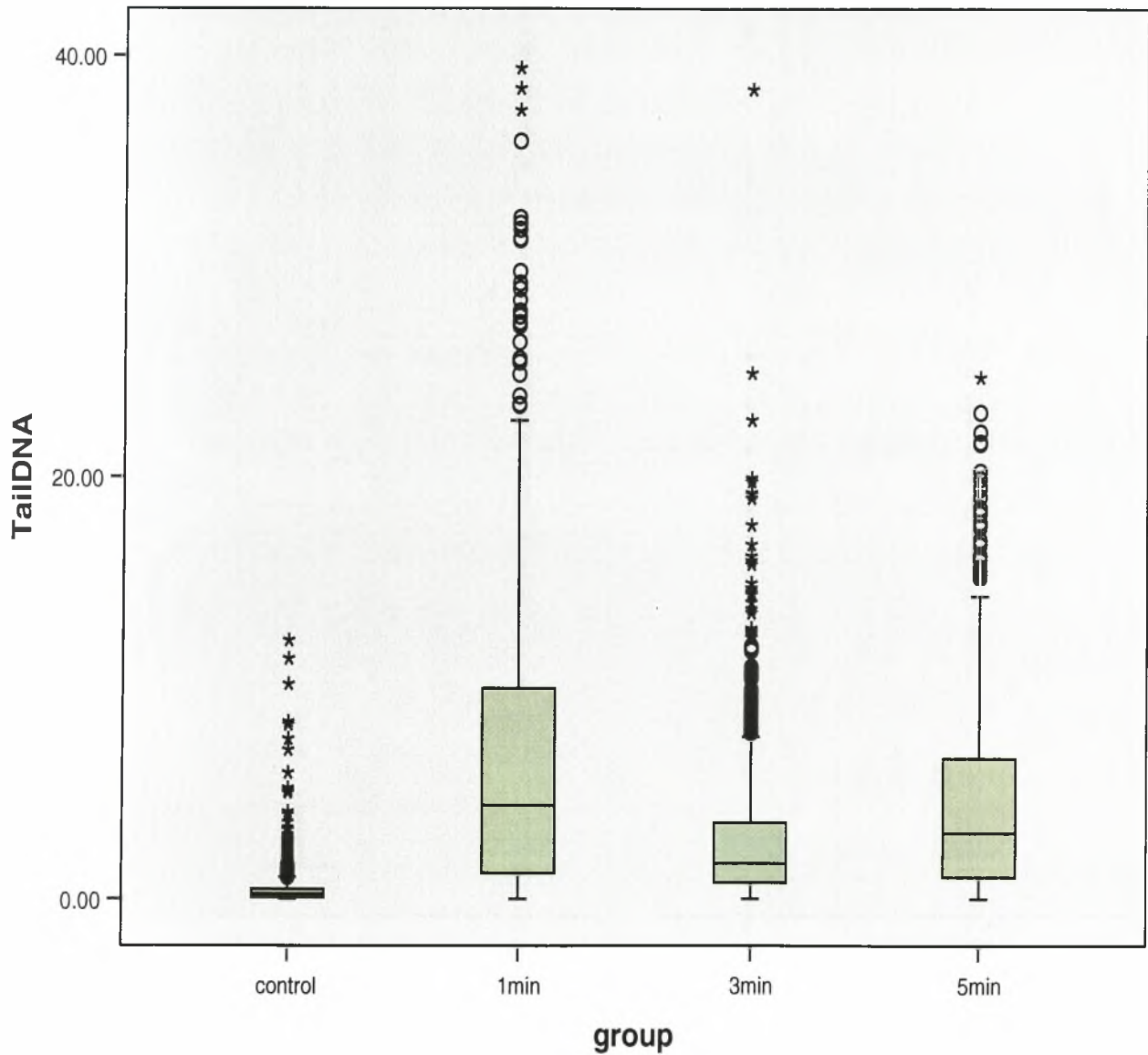
Σχήμα 2. Γραφική απεικόνιση της μεταβλητής Tail Length με τις μεταχειρίσεις των ψαριών για διαφορετικούς χρόνους.

Στο σχήμα 3 απεικονίζονται οι μέσοι όροι της μεταβλητής της απόστασης μεταξύ του κέντρου βαρύτητας της ουράς του DNA και του κέντρου βαρύτητας της κεφαλής του (Comet Length) για κάθε χρονική διάρκεια καταπόνησης στις δύο μεταχειρίσεις (μάρτυρας και καταπόνηση).



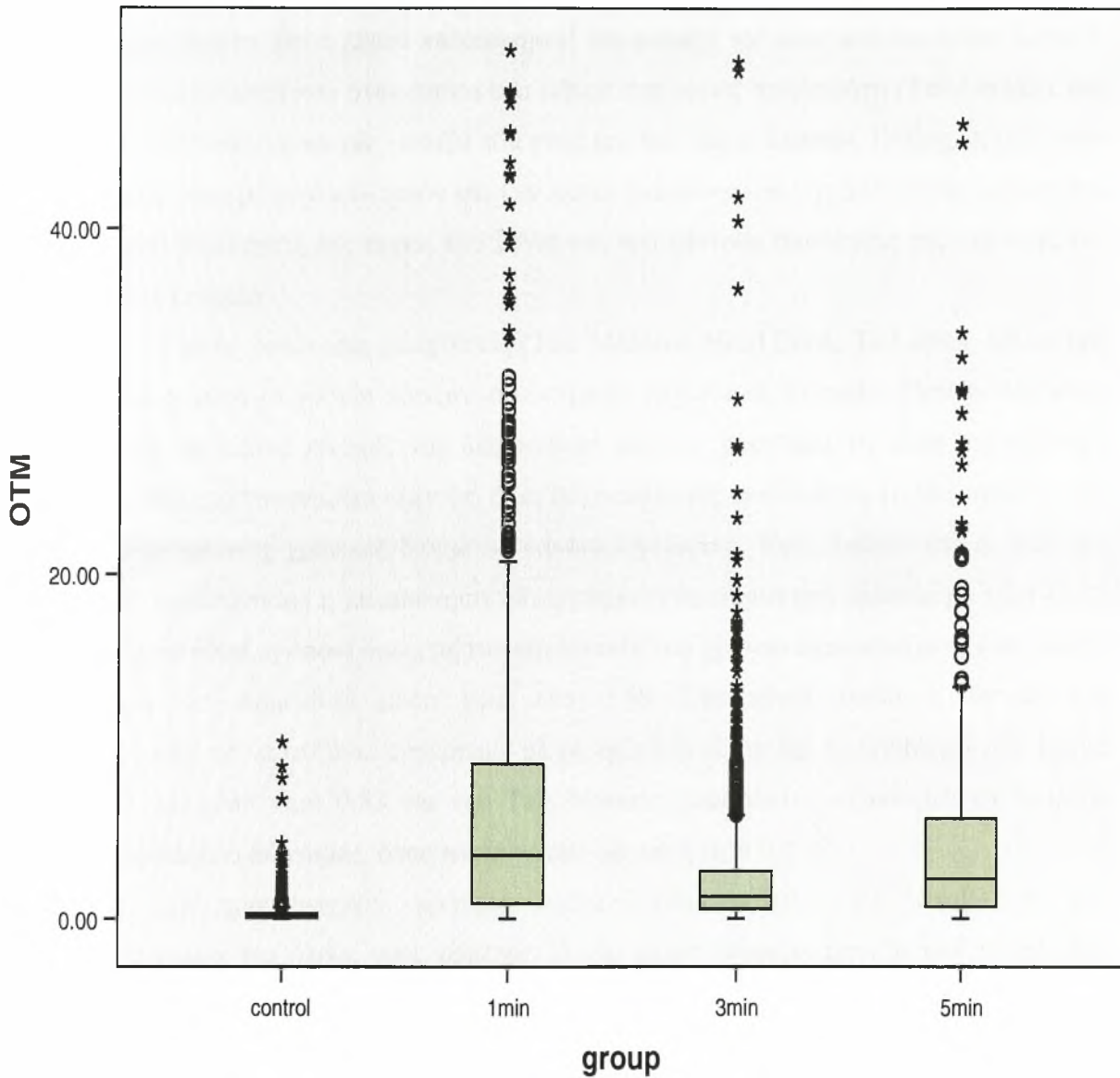
Σχήμα 3. Γραφική απεικόνιση της μεταβλητής Comet assay assay Length με τις μεταχειρίσεις των ψαριών για διαφορετικούς χρόνους.

Στο σχήμα 4 απεικονίζονται οι μέσοι όροι της μεταβλητής της απόστασης μεταξύ του κέντρου βαρύτητας της ουράς του DNA και του κέντρου βαρύτητας της κεφαλής του (Tail DNA) για κάθε χρονική διάρκεια καταπόνησης στις δύο μεταχειρίσεις (μάρτυρας και καταπόνηση).



Σχήμα 4. Γραφική απεικόνιση της μεταβλητής Tail DNA με τις μεταχειρίσεις των ψαριών για διαφορετικούς χρόνους.

Στο Σχήμα 5 απεικονίζονται οι μέσοι όροι της μεταβλητής της απόστασης μεταξύ του κέντρου βαρύτητας της ουράς του DNA και του κέντρου βαρύτητας της κεφαλής του (Olive Tail Moment) για κάθε χρονική διάρκεια καταπόνησης στις δύο μεταχειρίσεις (μάρτυρας και καταπόνηση).



Σχήμα 5. Γραφική απεικόνιση της μεταβλητής Olive Tail Moment με τις μεταχειρίσεις των ψαριών για διαφορετικούς χρόνους.

Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι για όλες τις μεταβλητές που μελετήθηκαν (Head Length, Tail Length, Comet Length, Tail Moment, Head DNA, Tail DNA, Olive Tail Moment) υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για όλες σχεδόν τις χρονικές διάρκειες που μελετήθηκαν. Είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι όλοι οι χρόνοι διέφεραν σημαντικά από τον μάρτυρα.

Για κάποιες από τις μεταβλητές δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές. Αυτό παρατηρήθηκε στην περίπτωση του μήκους κεφαλής του DNA (Head Length) για τον μάρτυρα και τα πέντε λεπτά καταπόνησης και μεταξύ του ενός και των τριών λεπτών. Για τη μεταβλητή που αναφέρεται στο μήκος της ουράς του κομήτη (Tail Length), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ του ενός και των πέντε λεπτών. Επίσης, η ίδια τάση παρατηρείται μεταξύ των τριών και των πέντε λεπτών για το της απόστασης μεταξύ του κέντρου βαρύτητας της ουράς του DNA και του κέντρου βαρύτητας της κεφαλής του (Comet Length).

Για τις υπόλοιπες μεταβλητές (Tail Moment, Head DNA, Tail DNA, Olive Tail Moment) όλοι οι χρόνοι έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Εκείνο που είναι φανερό από τους πίνακες και διακρίνεται, επίσης, ξεκάθαρα (ή είναι περισσότερο ευκρινές) στα γραφήματα είναι ότι όλες οι μεταβλητές ακολουθούν το ίδιο πρότυπο για τις διαφορετικές χρονικές διάρκειες κακομεταχείρισης. Έτσι, λοιπόν έπειτα από ένα λεπτό καταπόνησης η καταπόνηση καταγράφεται σε σημαντικό επίπεδο με τιμή 11,85 κατά μέσο όρο, η οποία όμως με την παρέλευση του χρόνου παρουσιάζει αξιοσημείωτη κάμψη και σημειώνει μέση τιμή στα 0,58. Στα πέντε λεπτά η καταπόνηση καταγράφεται να αυξάνει συγκριτικά με τα τρία λεπτά και όχι περισσότερο από το ένα λεπτό με μέση τιμή 0,88 για την Tail Moment μεταβλητή. Αξιοσημείωτη διαφορά παρουσιάζει ο μάρτυρας, όπως αναμενόταν, με μέση τιμή 0,17.

Το προαναφερθέν πρότυπο ακολουθείται σε όλες τις μεταβλητές που μελετήθηκαν για όλους τους κομήτες. Η πιο μικρή διαφορά μεταξύ των τριών (μ.ο. 216,31) και των πέντε λεπτών (μ.ο. 221,66) διακρίνεται στο μήκος των κομητών (Comet Length), όπου το πρότυπο εξακολουθεί να υφίσταται, αλλά με πολύ μικρή διαφορά σε αυτή την περίπτωση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Comet assay έχει βρει ευρεία εφαρμογή ως μια απλή και ευαίσθητη τεχνική υπολογισμού της *en vivo*, καθώς και της *in vitro* καταστροφής του DNA σε διαφορετικούς ιστούς (βράγχια, συκώτι, αίμα) ψαριών εκτεθειμένων σε ποικίλους παράγοντες στο υδρόβιο περιβάλλον. (Winter *et al.*, 2004).

Στην παρούσα εργασία η παράμετρος που μελετήθηκε για την πρόκληση καταπόνησης σε εκτρεφόμενους ιχθείς ήταν η κακομεταχείριση σε διαφορετικές χρονικές διάρκειες. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν είναι εμφανές ότι οι ιχθείς καταπονήθηκαν περισσότερο κατά την κακομεταχείριση που υπέστησαν στη διάρκεια του ενός λεπτού. Λόγω του γεγονότος ότι η καταστροφή του DNA κατά το ένα λεπτό είναι μακράν μεγαλύτερη από τις άλλες δύο χρονικές διάρκειες, μπορεί να σημαίνει ότι η τεχνική της comet assay συμβάλλει εδώ στην καλύτερη αποτύπωση της οξείας μορφής καταπόνησης.

Η Fanouraki *et al.*, (2007) μελέτησαν την κορτιζόλη ως δείκτη απόδοσης της οξείας μορφής καταπόνησης στο φαγγρί (*Pagrus pagrus*) έπειτα από 10 λεπτά συνεχόμενης κακομεταχείρισης και αποφάνθηκαν ότι πρόκειται για έναν ιδιαίτερα αξιόπιστο δείκτη, καθώς η κορτιζόλη δίνει πολύ καλά αποτελέσματα για την εκτίμηση της οξείας μορφής καταπόνησης.

Οι Wiseman S. και συν., (2007) μελέτησαν την οξεία μορφή καταπόνησης σε σαλμονοειδή με τη βοήθεια της κορτιζόλης. Οι ιχθείς υπέστησαν κακομεταχείριση τριών λεπτών κι έπειτα από την πάροδο μιας ώρας πραγματοποιήθηκε αιμοληψία, η οποία έδωσε συμπεράσματα οξείας καταπόνησης. Η επίδραση της καταπόνησης έπαψε να υφίσταται με την παρέλευση ενός εικοσιτετραώρου.

Στο σολομό *Oncorhynchus tshawytscha* οι Barton *et al.*, (2003) έδειξαν ότι η καταπόνηση λειτούργησε συσσωρευτικά έπειτα από συνεχείς και απότομες κακομεταχειρίσεις διάρκειας 30 λεπτών που επαναλαμβάνονταν σε διαστήματα τριών ωρών ανά έξι ώρες.

Η κακομεταχείριση διάρκειας τριών λεπτών έδειξε σημαντική κάμψη της καταπόνησης, καθώς η καταστροφή που σημειώθηκε στο γενετικό υλικό ήταν αρκετά μικρότερη κι αυτό ενισχύει ολοένα και περισσότερο την υπόθεση ότι πρόκειται για καταγραφή μιας χρόνιας μορφής καταπόνησης (Belraeme *et al.*, 1998), στην οποία ο οργανισμός συνηθίζει έπειτα από την παρέλευση του χρόνου.

Στον μπακαλιάρο (*Melanogrammus aeglefinus*), οι Hosoya *et al.* (2007), βρήκαν ότι τα άτομα εξακολουθούσαν να είναι καταπονημένα και κατά τη δεύτερη εβδομάδα του πειράματος με ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα της κορτιζόλης έως τότε. Σε πείραμα που εξετάστηκε η καταπόνηση μικρής χρονικής διάρκειας, ο σολομός του Ατλαντικού παρουσίασε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης για τρεις ώρες, τα οποία μειώθηκαν μετά το πέρας έξι ωρών. Το αυξημένο ποσοστό κορτικοστεροειδών στο αίμα έχει προταθεί ως ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που εξηγούν τη χρόνια μορφή καταπόνησης στα σολομοειδή (Redding *et al.*, 1984).

Η μεγάλης διάρκειας υποβολή της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) σε παράγοντες καταπόνησης έδειξαν ότι η συνεχόμενη εφαρμογή ενός παράγοντα που προκαλεί την οξεία της μορφή μέσα σε χρονικό διάστημα τεσσάρων εβδομάδων, δεν επιδρά στη χρόνια μορφή καταπόνησης μελετώντας τα επίπεδα της κορτιζόλης. Στην πέστροφα, η αυξημένη ιχθυοφόρτιση κατά το χειρισμό για 21 ημέρες συνέβαλε στην αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης έως και την δέκατη ημέρα και μετά επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα. (Pickering & Pottinger, 1987, 1989). Η καταπόνηση της καφέ πέστροφας για την ίδια περίοδο, προκάλεσε αυξημένα επίπεδα καταπόνησης κατά τις πρώτες δύο ημέρες. Περίπου την έκτη ημέρα η κορτιζόλη έπεσε στα ίδια επίπεδα των τιμών πριν από την κακομεταχείριση (Pickering & Pottinger, 1987).

Οι Webb *et al.*, (2007), έπειτα από κακομεταχείριση με σειρά καταπονητικών παραγόντων στο ωχρό στουρίονι, *Scaphirhynchus albus*., μέτρησαν την κορτιζόλη στο αίμα έξι και 12 ώρες μετά το περιστατικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κορτιζόλη παρουσίασε σημαντική αύξηση κατά τις πρώτες έξι ώρες, ενώ κατά τις έξι τελευταίες κατεγράφη σημαντική μείωσή της.

Οι. Belraeme *et al.*, (1998) απέδειξαν ότι η παρατεταμένη έκθεση πλατύψαρων σε methyl methanesulphonate-EMS αυξάνει την καταπόνηση των ιχθύων. Συγκεκριμένα, έπειτα από την έκθεση τριών ημερών των ψαριών στην ουσία αποτυπώθηκε σε κύτταρα ήπατος ότι η έκθεση δύο ημερών στον παράγοντα καταπόνησης, προκάλεσε μεγαλύτερη καταστροφή του γενετικού υλικού απ' ότι έπειτα από επτά μέρες έκθεσης με σημαντική διαφορά.

Οι Pickering και Pottinger (1989) μελέτησαν την καταπόνηση στα σολομοειδή μετρώντας την κορτιζόλη στο αίμα των ιχθύων. Αποφάνθηκαν ότι έπειτα από μια ώρα κακομεταχείρισης σημειώθηκε οξεία καταπόνηση, η οποία έπειτα από 24 με 48 ώρες

μειώθηκε αγγίζοντας σχεδόν τα κανονικά επίπεδα. Σε αυτή την περίπτωση οι ερευνητές κάνουν λόγο για χρόνια μορφή καταπόνησης.

Στα πέντε λεπτά στο DNA των ιχθύων σημειώθηκε αυξημένη καταστροφή συγκριτικά με τη χρονική διάρκεια των τριών λεπτών, αλλά σε καμία περίπτωση μεγαλύτερη από εκείνη του ενός λεπτού για όλες τις μεταβλητές που μελετήθηκαν. Αυτό είναι δυνατό να σημαίνει ότι εδώ η καταπόνηση ενδεχομένως να δρα συσσωρευτικά με την οξεία και τη χρόνια μορφή της, δίνοντας μια μέση κατάσταση των δύο προηγούμενων. Μια ακόμη υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει σε αυτό το σημείο είναι ότι ενδεχομένως να πρόκειται και για διακεκομμένη μορφή καταπόνησης της οποίας τα αποτελέσματα δεν είναι ιδιαιτέρως σαφή, αλλά είναι διαφορετικά από εκείνα της χρόνιας μορφής.

Οι Marques *et al.*, (2003) απέδειξαν ότι η κακομεταχείριση που συμβαίνει σε ιχθείς μετά από το χειρισμό της αναισθησίας δεν προκαλεί καταπόνηση στους οργανισμούς. Αυτό συνάγεται από τα αποτελέσματα που δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην καταπόνηση μέσα σε 48 ώρες από την αναισθησία.

Οι Dailianis *et al.*, (2005) έπειτα από έκθεση του μυδιού, *Mytilus galloprovincialis*, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καδμίου για 30 λεπτά, διαπίστωσαν ότι η έκθεση σε αυξημένες συγκεντρώσεις του στοιχείου παρουσίαζαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους, καθώς, έτσι, αυξήθηκε η καταστροφή στο γενετικό υλικό του μυδιού με τρόπο που συμφωνούσε με την αύξησης έκθεσης στο κάδμιο.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχει ανάγκη για ευαίσθητες μεθόδους, οι οποίες είναι κατάλληλες για την εκτίμηση της χρόνιας επίδρασης διαφόρων παραγόντων στους οργανισμούς. Η Comet assay είναι μια τεχνική που υπόσχεται πολλά προς την κατεύθυνση της ανίχνευσης ζημιών στο DNA, όπως αποτυπώνονται σε αυτό έπειτα από έκθεση των οργανισμών σε ζημιογόνους παράγοντες. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε εμφανές ότι η Comet assay είναι σε θέση να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα, τόσο στη μελέτη χρόνιας όσο και οξείας μορφής καταπόνησης. Ωστόσο, είναι αναγκαία η τελειοποίηση της μεθόδου για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα στο μέλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B., J. and Schmezer P. (1994). The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat. Res.* 307: 261-271.

Banath O. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.*, 1 (1):23-9.

Barton, B., Schreck, C. and Barton, L. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, (2): 173-185.

Belpaeme K., Cooreman K. and Kirsch Volders M. (1998). Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*, 415: 167–184.

Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhler S. and Speit G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20(4): 245-254.

Collins A., Dobson V., Dusinska M., Kennedy G. and Stetina R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.*, 375: 183–193.

Collins A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3):249-262.

Fanouraki, E., Laitinen, J. T., Divanach, P. and Pavlidis M. (2007): Endocrine regulation of skin blanching in red porgy, *Pagrus pagrus*. *Ann. Zool. Fennici* 44: 241–248.

Faust F., Kassie F., Knasmüller F., Boedecker R. H., Mann M. and Mersch-Iwana G. K. (1997). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Science*, 851: 304-310.

Hosoya S., Johnson S. C., Iwama G. K., Gamperl A. K. and Afonso L. O. (2007). Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146 (1): 78-86.

Klaude M., Eriksson S., Nygren J. and Ahnstrom G. (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363: 86–89.

Kumaravel T. S. and Jha A. N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.* 605 (1–2): 7–16.

Lines J. A. and Frost A. R. (1999). Review of opportunities for low stress and selective control of fish. *Aquaculture Engineering*, 20: 211-230.

Miyamae Y., Iwasaki K., Kinae N., Tsuda S., Murakami M and Tanaka M. (1997) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay: relationship between DNA migration and alkaline conditions. *Mutat Res*: 393:107–13.

Moller P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96 (1):1-42.

Moller P. (2006) The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98(4):336–45.

Mommsen T. P. and Vijayan M. M. (2007). Gene expression patterns in the liver during recovery from an acute stressor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, D: Genomics and Proteomics*.

Morley N., Rapp A., Dittmar H., Salter L., Gould D. and Greulich K. (2006) UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*, 21 (2): 105–14.

Nelms B. (1997). Measuring apoptosis in individual cells with the comet assay. *Promega Notes*, 64: 13–16.

Os Singh N., McCou M., Tice R. and Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175: 184–191.

Ostling O. and Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291–298.

Pankhurst N. W., Van Der Kraak G. and Peter R.E. (1995). Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 99 (3): 249-257.

Pottinger T. G. and Pickering A. D. (2006). The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 41 (3): 435-447.

Power M. (1997). Assessing the effects of environmental stressors on fish populations. *Aquatic Toxicology*, 39: 151-169.

Redding J. M., Schreck C. B., Birks E. K. and Ewing R. D. (1984). Cortisol and its effects on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in fresh water and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen Comp. Endocrinol., 56 (1):146-55.

Singh N. P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutat Res., 455 (1–2):111–27.

Shackleton C. (2007). Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology. 154: 98-104.

Sundermann V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. Reviews in Mutation Research 566 (3): 209-229.

Tice R. (1995). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Philips DH, Venitt S. Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publ., 315–339.

Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., Yasuhara, Y. and Kaneki M. (2003) Comparison of comet assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis. J. Histochem Cytochem. 51(7):873–85.

Weerd Van J. H. and Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology, 120: 107-112.

Winter M. J., Day N., Hayes R. A., Taylor E. W., Butler P.J. and Chipman J. K. (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. Mutat Res. 552(1–2):163–75.

Wiseman S., Oschaff H., Bassett E., Malhotra J., Bruno J., Van Aggelen G., Webb M., Allert J., Kappenman K., Marcos J., Feist G., Schreck C., Ribeiro

D., Marques M. and Salvadori D. (2007). Lack of Effect of Prior Treatment with Fluoride on Genotoxicity of Two Chemical Agents in vitro. *Caries Research.*, 41(3): 239-243.

Ελληνική βιβλιογραφία

Νεοφύτου Χ. (2001).Βιολογία Θαλάσσιων Οργανισμών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νταϊλιάνης Σ. (2005). Μελέτη βιοχημικών παραμέτρων και μηχανισμών που σχετίζονται με την μεταγωγή του σήματος στους ιστούς του μυδίου *Mytilus galloprovincialis* (Lmc) μετά από έκθεσή του σε ρυπογόνους παράγοντες. Συμβολή στην καθιέρωση νέων βιομαρτύρων ρύπανσης. Διδακτορική διατριβή.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000110304